

Induction of Ovulation and
Embryo-biotechnological production of
Hereditary Hypothyroid Infertile rdw Rat(**遺伝
的甲状腺機能低下症不妊rdwラットの排卵誘起と発
生工学的生産に関する研究**)

著者	江 金益
号	571
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/15983

氏 名(国籍)	江 ^{こう} 金 ^{きん} 益 ^{えき}
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 5 7 1 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科畜産学専攻 (博士課程)
学位論文題目	Induction of Ovulation and Embryo- biotechnological production of Hereditary Hypothyroid Infertile <i>rdw</i> Rat (遺伝的甲状腺機能低下症不妊 <i>rdw</i> ラットの排卵誘起 と発生工学的生産に関する研究)
論文審査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 英 明 教 授 山 岸 敏 宏 教 授 鈴 木 惇 助教授 梅 津 元 昭

論文内容要旨

緒論

Wistar-Imamichi ラットから、*rdw* ラットと命名された突然変異種（ミュータント）の小人ラットが分離されているが、このミュータントは、常染色体劣性ホモでその形質を発現する。今まで、内分泌疾患を示すミュータントの小人症のモデル動物として、マウスやラットでそれぞれ数種のもものが知られているが、*rdw* ラットにおいても、主として、雄ラットを用いて内分泌学的特性や臨床生化学特性が検索されてきた。その結果、*rdw* ラットでは、甲状腺組織の退縮がみられること、血中の甲状腺ホルモン量が極端に低く、それに伴い、血中成長ホルモンやプロラクチン量も有意に低いこと、また、高コレステロール症、貧血症などのヒトの甲状腺機能低下症と同じ症状を示すことが明らかにされ、*rdw* ラットは先天的な甲状腺機能低下症であると結論づけられている。

rdw ラットはヒト下垂体性小人症や甲状腺機能低下症の動物モデルとして、生理学的、内分泌学的研究に適したモデルと考えられている。このミュータントは不妊であり、F1 同士の交配で産子を生産せざるを得ないが、このような生産方式は非常に非効率的である。そこで本研究では、発生工学的手法を用いて不妊 *rdw* ラットの大量生産と胚の凍結保存法の開発を目的とした。そのために、まず卵胞発育の動態(第 1 章)と卵胞に出入する血管の構築(第 2 章)を解析することにより *rdw* ラットにおける卵胞発育の特徴を調べ、次に *rdw* ラットにおける排卵誘起法について検討し(第 3 章)、*rdw* ラット由来卵子と F1 雄由来の精子(第 4 章)または *rdw* ラット由来の精子(第 5 章)を用いて体外受精-胚移植を行なうことにより産子を得る条件を検討した。さらに、胚の凍結保存を試みた(第 6 章)。その結果、*rdw* ラットの卵胞発育の特徴が明らかにされるとともに、排卵誘起法、体外受精と胚移植による産子生産法、および胚の凍結保存法を確立することができた。

第1章 未成熟 *rdw* ラットにおける卵胞発育の動態

rdw ラットの未成熟時の内分泌学的特徴を調べるために、生後 28 日と 30 日齢の血中性腺刺激ホルモン(卵胞刺激ホルモン: follicle stimulating hormone、FSH、黄体形成ホルモン: luteinizing hormone、LH)と血中甲状腺ホルモン(サイロキシン: thyroxine、T4)を測定し、同日齢の正常ラットと比較した。FSH と LH の値に両群で差はなかったが、*rdw* の T4 の値は正常のそれより顕著に低かった(Fig.1)。このような結果にもとづき、本章では、未成熟 *rdw* ラットの卵胞発育の動態を調べるにより、多数の卵胞が発達する条件を求めた。生後 28 日 *rdw* ラット、生後 21 日から T4 を 9 日間処理 (T4 前処理) した生後 28 日の *rdw* ラットに、それぞれ無処理または妊馬血清性性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin、PMSG) 処理し、48 時間後に屠殺し、卵巢重量を測定し、固定包埋後 8 μ m の連続切片を作成し、HE 染色を行い、種々の大きさの健常および退行卵胞の分布を調べた。その結果、*rdw* ラットの卵巢の

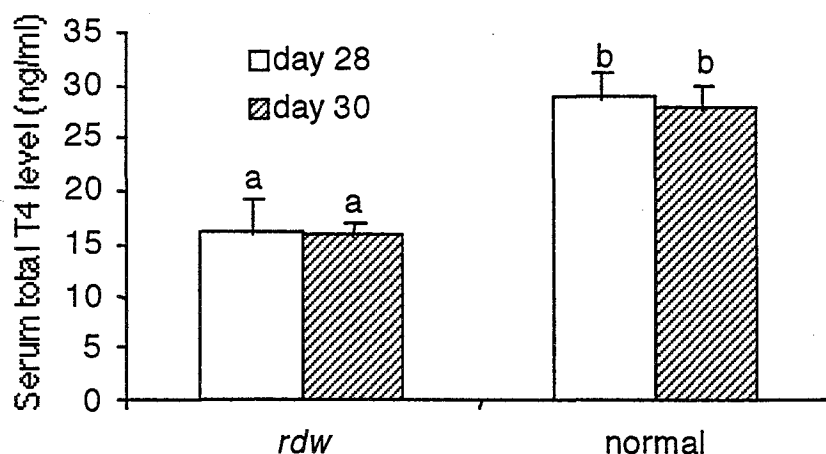


Fig.1. Serum total T4 levels in control *rdw* and normal rats on postnatal days 28 and 30

^{a-b} Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.01$)

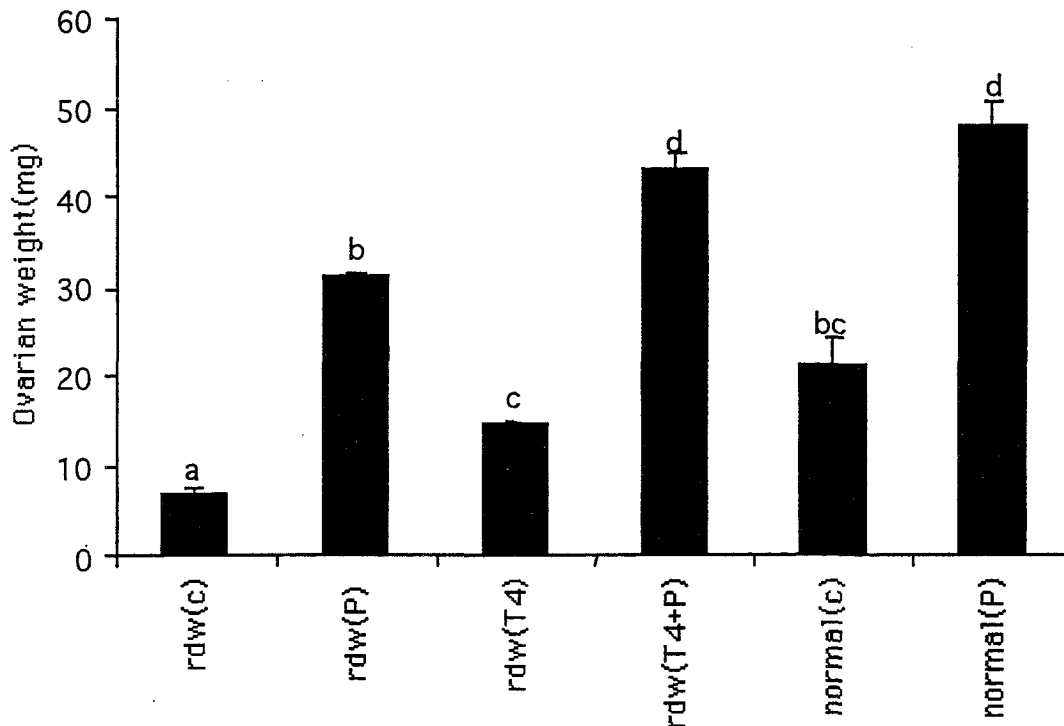


Fig.2. Effects of PMSG and T4 on ovarian weight in *rdw* rats. Bars represent means \pm SE of weight of ovarian pairs. Rats were treated with PMSG alone(P), T4 alone(T4) or a combination of T4 and PMSG(T4+P). Untreated *rdw* and normal rats were used as controls(c). Normal rats treated with PMSG were also examined. a-d, $P < 0.01$ or less.

大きさは、T4 前処理により有意に増加し、PMSG 処理によりさらに増加し、T4+PMSG 処理により、PMSG 処理の場合よりさらに有意に増大して正常ラットに PMSG 処理した場合の卵巢の大きさと差がなくなった(Fig.2 と 3)。無処理の *rdw* ラットでは、T4 投与により直径 101-199 μm 、200-400 μm の健常卵胞数が有意に増加した。また PMSG 投与により 400 μm 以上の大きさの卵胞が多数出現したが、正常ラットで見られた 550 μm 以上の大きさのグラフ卵胞数は有意に少なかった。T4+PMSG 処理では、550 μm 以上のグラフ卵胞が出現し、正常ラットのそれと有意差がなくなるまでに数が増加し(Fig.4 と Table 1)、健常卵胞数の変化は卵巢重量の大きさの変化とよく一致した。退行卵胞数は、無処理、T4 前処理、PMSG 処理群が正常ラットのそれよりも多い傾向にあった

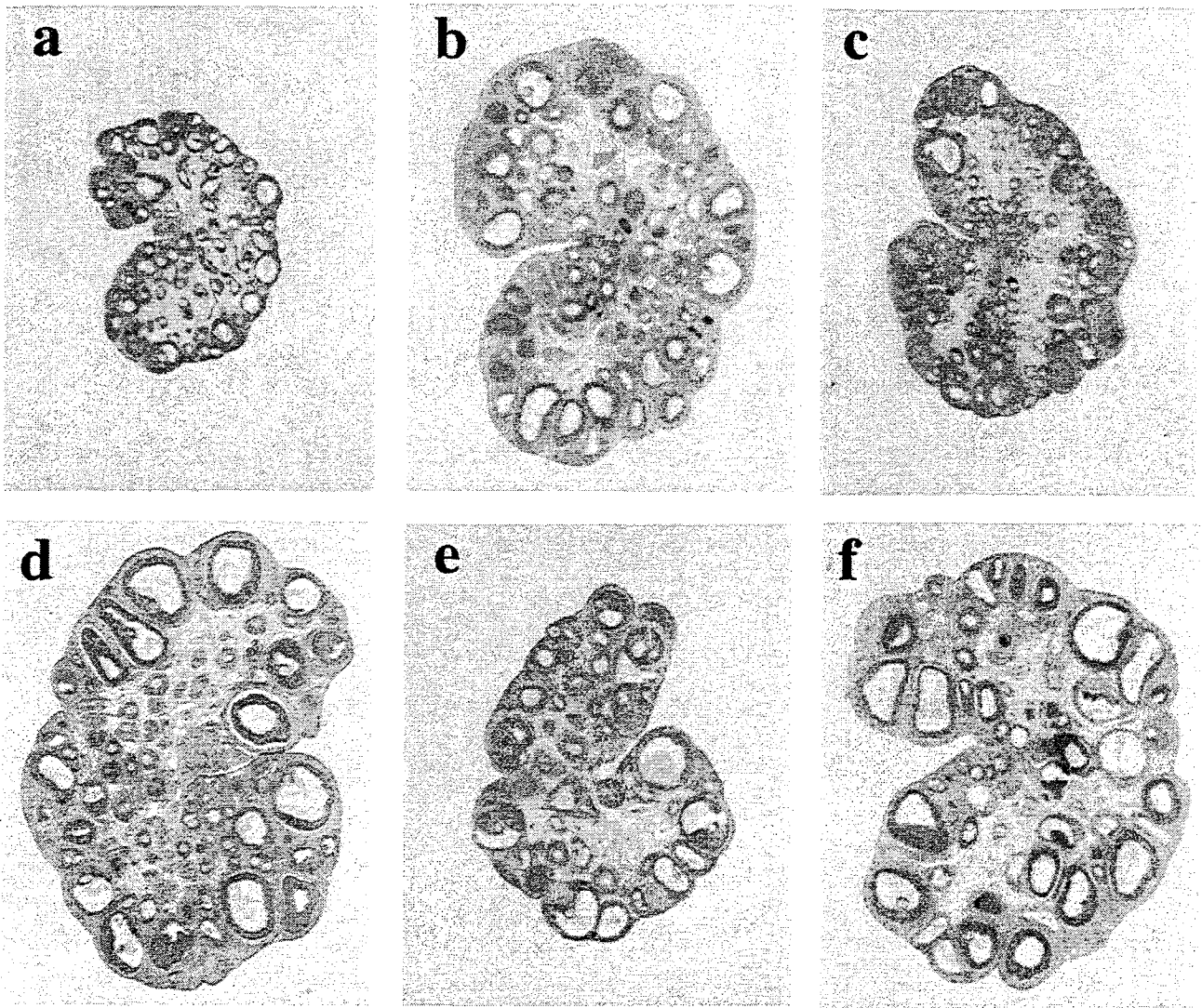


Fig.3. Ovarian sections of *rdw* (a,control; b,PMSG alone; c,T4 alone and d,T4+PMSG) and normal (e,control and f,PMSG) rats at 30 days old. H.E. staining. ($\times 20$)

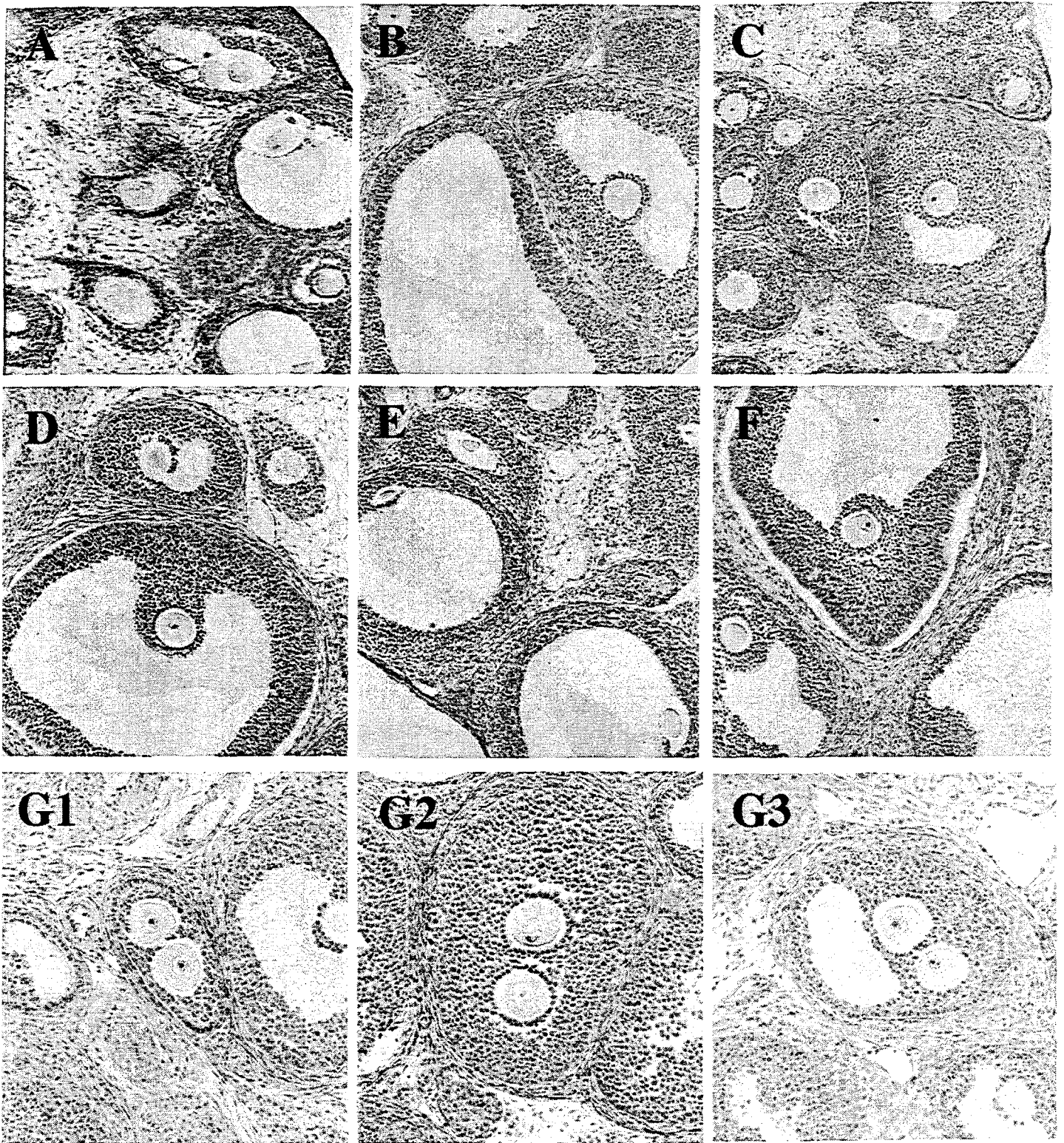


Fig.4. Ovarian sections of *rdw*(A,control; B,PMSG alone; C,T4 alone and D,T4+PMSG) and normal(E,control and F,PMSG) rats at 30 days old. Preantral (G1) and antral (G2 and G3) polyovular follicles with 2 oocytes. H.E. staining. ($\times 65$)

Table 1. Healthy antral follicles in an ovary of immature *rdw* and normal rats with different thyroxine and PMSG treatment regimens

	No. of healthy antral follicles in diameter (μm) of					
	Total No.	101-199	200-400	401-499	500-550	>550
R(c)	167 \pm 14a	125 \pm 12a	42 \pm 10a	0	0	0
R(T4)	333 \pm 21b	212 \pm 19b	113 \pm 15b	8 \pm 2a	0	0
R(P)	306 \pm 24b	147 \pm 15a	114 \pm 16b	21 \pm 5b	16 \pm 5b	8 \pm 2a
R(T4+P)	271 \pm 18b	138 \pm 13a	91 \pm 10b	11 \pm 3ab	7 \pm 2a	24 \pm 6b
N(c)	169 \pm 18a	115 \pm 16a	41 \pm 9a	8 \pm 2a	5 \pm 1a	0
N(P)	311 \pm 26b	172 \pm 17ab	88 \pm 12b	11 \pm 4ab	7 \pm 2a	33 \pm 7b
R(c)	(1 \pm 1)a	0	(1 \pm 1)a	0	0	0
R(T4)	(5 \pm 2)ab	(1 \pm 1)	(3 \pm 1)ab	(1 \pm 1)	0	0
R(P)	(2 \pm 1)ab	0	(1 \pm 1)a	(1 \pm 0)	0	0
R(T4+P)	(6 \pm 2)b	0	(6 \pm 2)b	0	0	0
N(c)	(1 \pm 1)a	0	(1 \pm 1)a	0	0	0
N(P)	(2 \pm 1)ab	(1 \pm 1)	(1 \pm 0)a	0	0	0

R, *rdw* rats; N, normal rats; c, control; P, PMSG treatment; T4, thyroxine therapy; (), number of follicles with 2 oocytes($P<0.01$)

Table 2. Atretic antral follicles in an ovary of immature *rdw* and normal rats with different thyroxine and PMSG treatment regimens

	No. of atretic antral follicles in diameter (μm) of					
	Total No.	101-199	200-400	401-499	500-550	>550
R(c)	84 \pm 15	23 \pm 7a	61 \pm 6	0	0	0
R(T4)	96 \pm 14	34 \pm 6a	61 \pm 7	0	1 \pm 1b	0
R(P)	98 \pm 16	9 \pm 2b	68 \pm 7	12 \pm 2a	8 \pm 2a	1 \pm 1
R(T4+P)	57 \pm 5	12 \pm 4b	42 \pm 5	3 \pm 1b	0	0
N(c)	66 \pm 10	14 \pm 4b	43 \pm 10	5 \pm 2b	2 \pm 1b	2 \pm 1
N(P)	58 \pm 11	5 \pm 1b	49 \pm 5	3 \pm 1b	1 \pm 0b	0

R, *rdw* rats; N, normal rats; c, control; P, PMSG treatment; T4, thyroxine treatment($P<0.01$)

が、T4+PMSG 処理により退行卵胞数が正常ラットのレベルにまで減少した (Table 2)。また、正常ラットでは、PMSG 処理後 52-56 時間に LH のサージが

みられたが、T4 前処理の *rdw* ラットでは LH サージはみられなかった(Fig.5)。以上の結果から、T4 前処理により卵胞の発育が促進され、さらに PMSG 処理により、排卵可能な健常グループ卵胞数が PMSG 処理した正常ラットのそれと差がない程に増加し、退行卵胞総数も正常ラットのそれと同じほどに減少するが、PMSG+T4 処理では、LH サージが欠如することが判った。これらのことから、未成熟 *rdw* ラットに排卵可能な卵胞を発達させるには、PMSG 処理以前に T4 の処理が必要なこと、さらに排卵を誘起するためには内因性 LH の放出がないことから外因性の排卵誘起ホルモンの投与が必要であることが明らかにされた。

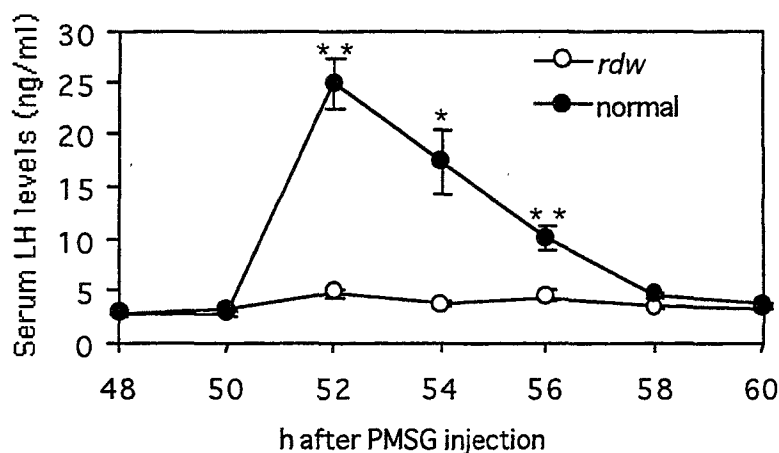


Fig.5. Serum LH profiles in PMSG-primed normal and *rdw* rats given T4 therapy

**P<0.01, *P<0.05

第2章 未成熟 *rdw* ラットにおける卵胞の血管構築

卵胞の発達と卵胞周囲における活発な血管の新生や分枝には強い相関があり、また、PMSG や FSH が卵胞の血管構築の発達を刺激することが知られている。このようなことから血管構築の増加により、体液を介して成長因子や栄養の卵胞への供給が促進され、その結果卵胞の発育が促進されると考えられる。このようなことから T4 処理による発育卵胞数の増加が血管構築の変化に影響される可能性が考えられるが、甲状腺ホルモンが卵胞の血管構築に及ぼす影響につ

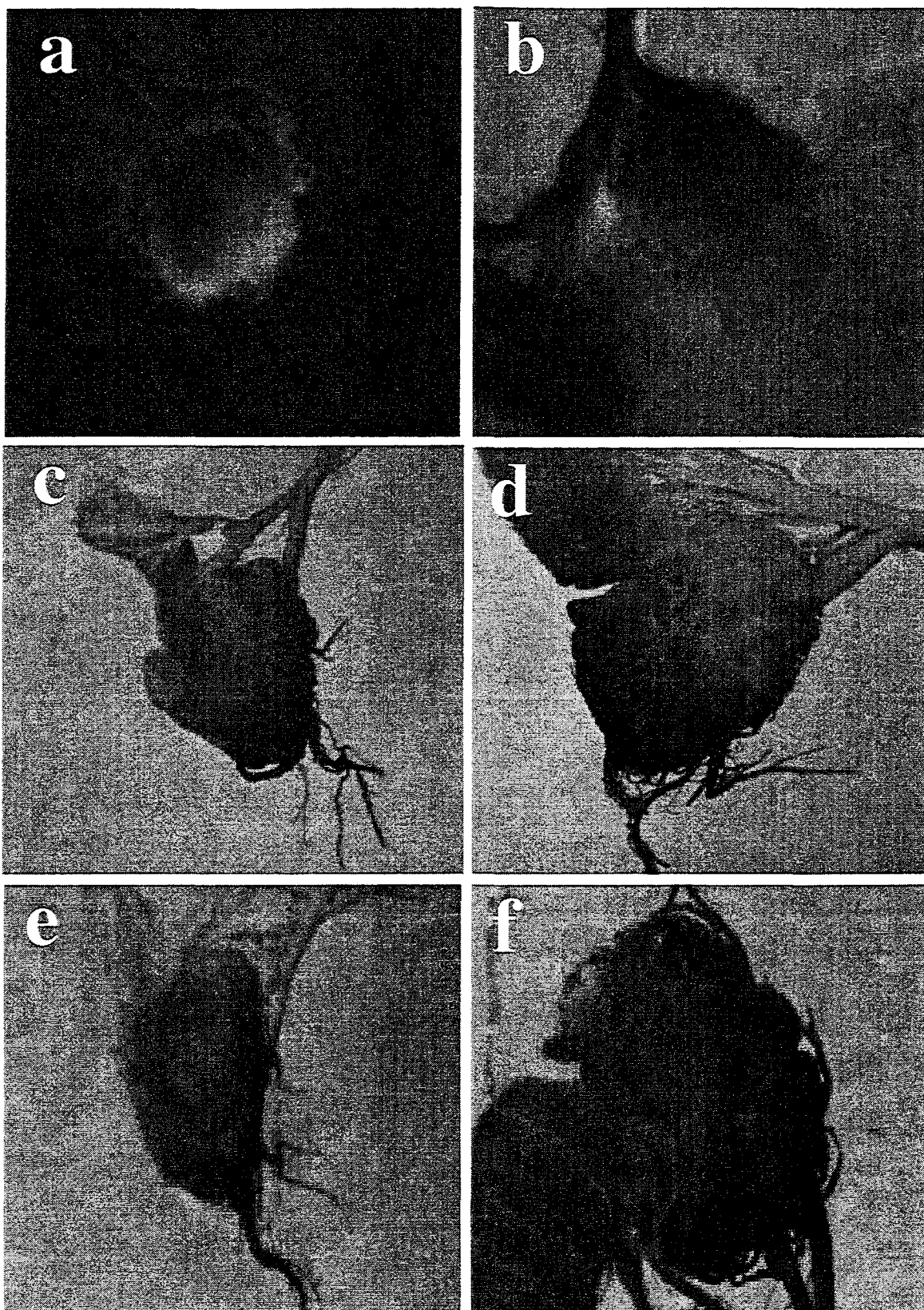
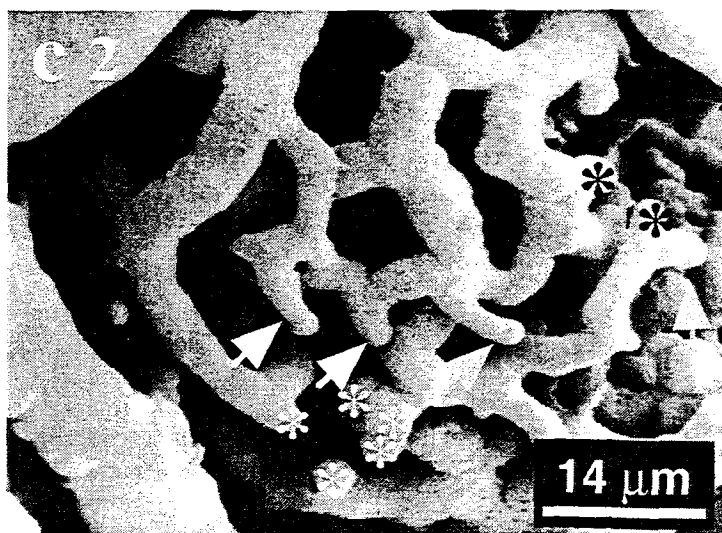
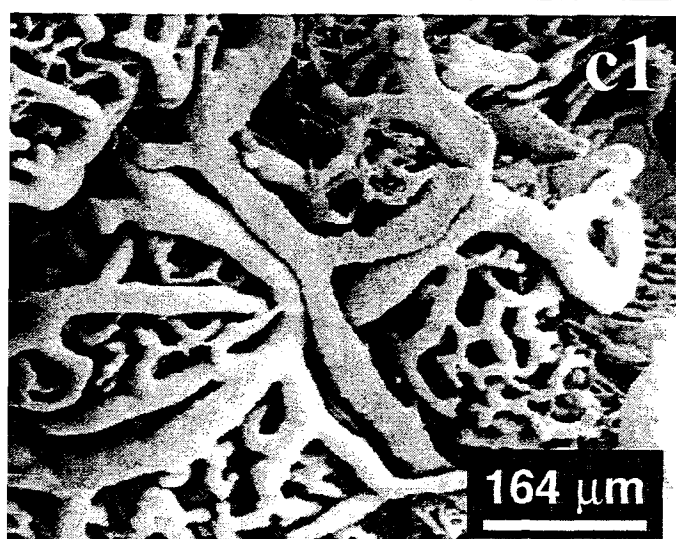
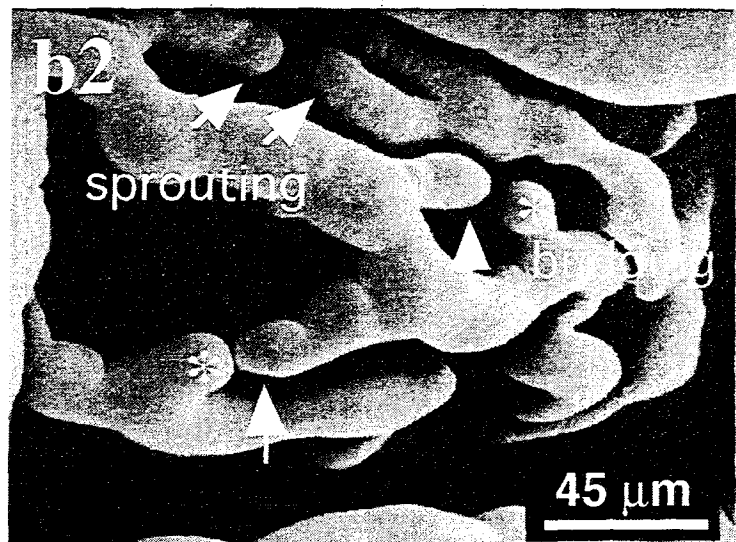
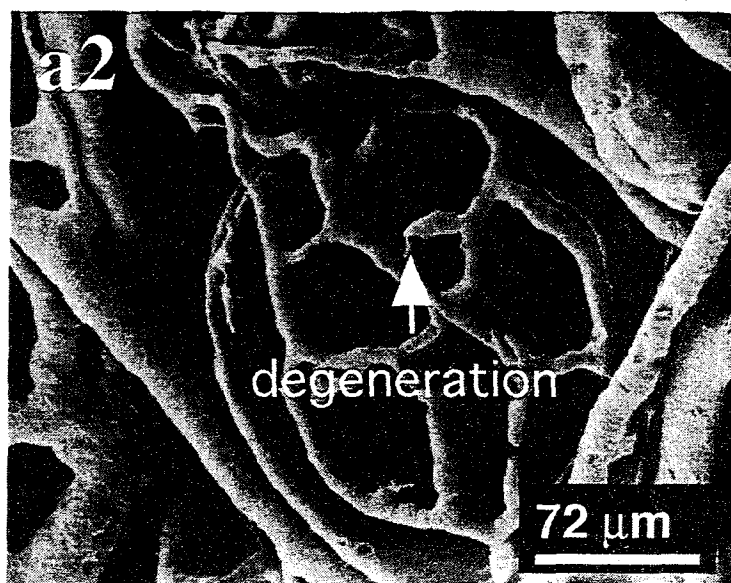
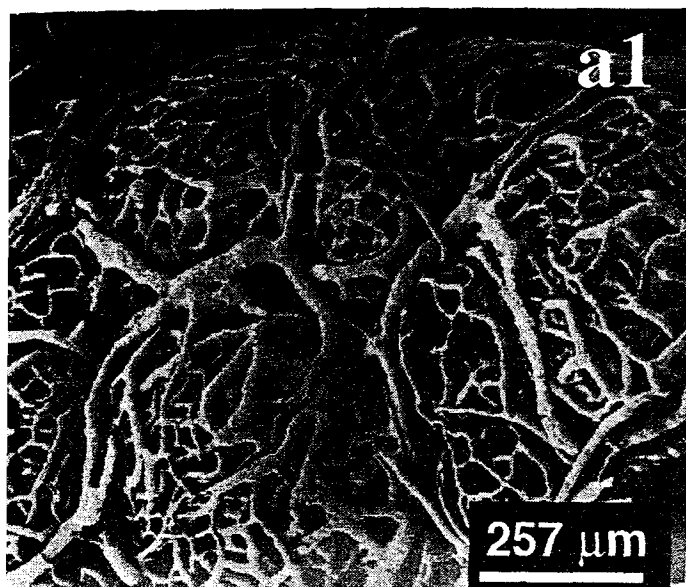


Fig.6. Light microscopy of ovarian corrosion casts from 30-day-old *rdw* rats without any treatment(a), with PMSG alone(b), with T4 alone(c), with T4 and PMSG(d) and normal counterparts without any treatment(e) or with PMSG(f). ($\times 11.4$)



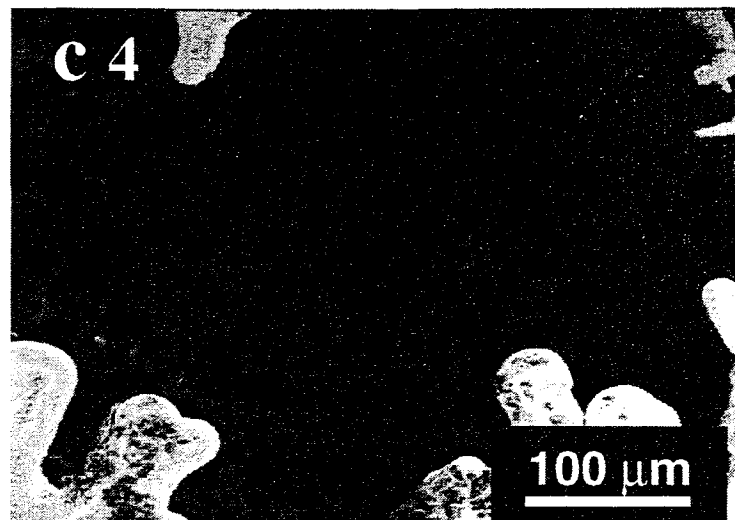
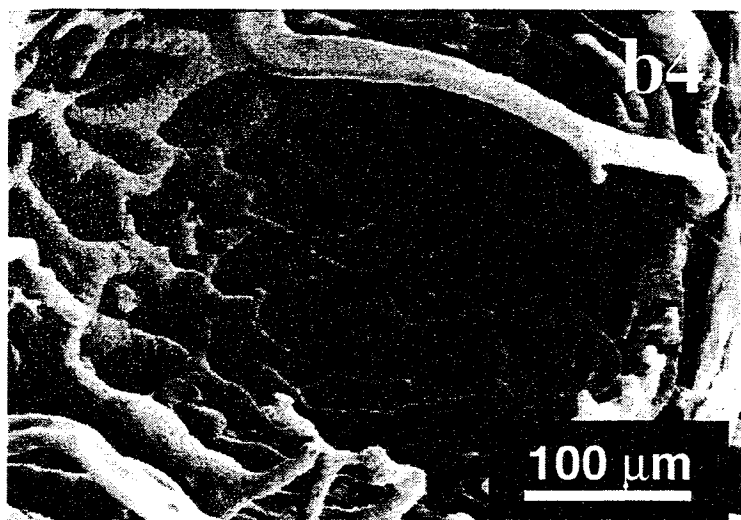
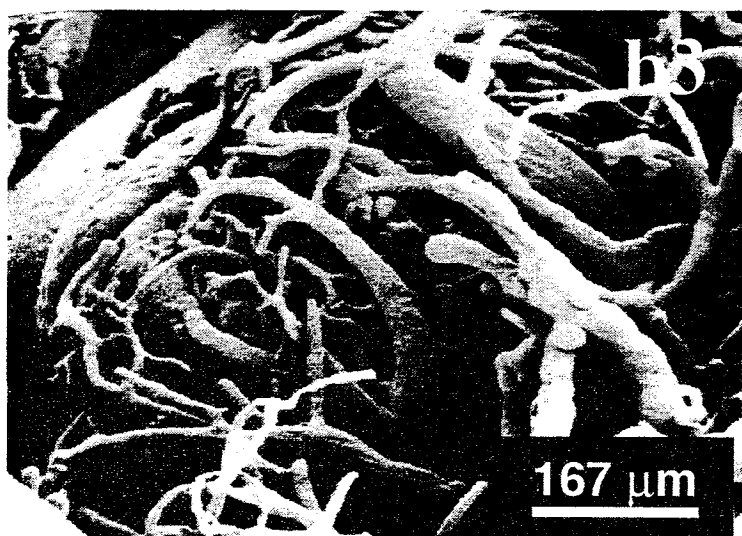


Fig.7.Ovarian microvasculature in immature *rdw* rats without(a1-a2) or with(b1-b4) PMSG or with T4 and PMSG (c1-c4) treatment.

いては今まで報告がない。そこで、*rdw* ラットの T4 および PMSG 処理の卵胞の血管構築に及ぼす影響についてコロジオンキャスト法を用いて解析した。光学顕微鏡による観察では、*rdw* ラット卵巢を取り囲む毛細血管叢の大きさは、無処理の正常のものより小さかったが、T4 前処理によりその大きさは増加した。*rdw* ラットに PMSG を処理すると、その大きさはさらに増大し、T4+PMSG 処理したものではさらに増大し、正常ラットに PMSG 処理したものに匹敵すようになった(Fig.6)。走査型電子顕微鏡による観察では、無処理 *rdw* ラットに毛細血管網が認められたが、多くの毛細血管は退行的状態にあった。PMSG を処理すると、毛細血管の拡大と出芽が認められ、血管が活発に新生していることが推察された。T4+PMSG 処理により血管新生はさらに活発化した(Fig.7)。以上のことから、未成熟 *rdw* ラットにおいて、甲状腺ホルモンが PMSG 処理後の血管の新生を誘起し、そのような血管新生が甲状腺ホルモンの卵胞発育促進効果と強い相関のあることが示唆された。

第3章 未成熟 *rdw* ラットにおける排卵の誘起

ラットにおいて人為的に排卵を誘起する場合、未成熟動物に PMSG 単独処理または PMSG 処理後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(human chorionic gonadotropin, hCG)を処理することにより行なわれている。前章までの実験により *rdw* ラットの卵胞発育に甲状腺ホルモンが必須であることが判った。そこで、本章では T4 前処理と性腺刺激ホルモンの処理を組み合わせることにより、未成熟 *rdw* ラットにおける排卵の人為的誘起を試みた。未成熟の *rdw* に、PMSG、PMSG+ hCG、T4+PMSG、ないし T4+PMSG+hCG を処理した。T4 は 10 μ g/100g 体重の量で生後 21 日から 30 日まで毎日腹腔内に注射し、PMSG は 28 日の午前 10 時、hCG は PMSG 処理 56 時間後にそれぞれに 10 IU 皮下注射した。PMSG 処理 72 時間後に排卵の有無と排卵数を調べた。その結果、*rdw* ラットでは、T4 無処理の場合と PMSG 単独処理では排卵が起きず、T4+PMSG+hCG 処理では

安定して排卵が誘起され、排卵数も劇的に上昇した。このことから T4 前処理が過排卵の誘起に必須であることが判った(Table 3)。

Table 3. Effect of gonadotrophins and thyroxine on the ovulation in immature *rdw* rats and normal littermates

			<i>rdw</i>		normal	
Hormones administered			No. of rats	No. of eggs	No. of rats	No. of eggs
T4	PMSG	hCG	ovulated/tested	collected/rat	ovulated/tested	collected/rat
—	+	—	2/5	3±2 ^a	2/5	21±13
—	+	+*	5/5	5±2 ^a	5/5	45±12
+	+	—	1/5	1±1 ^a	3/5	26±15
+	+	+	5/5	85±5 ^b	5/5	68±12

^{a,b}Values with different superscripts within each column are significantly different($P<0.01$)

*The number of eggs collected in *rdw* rats is significantly lower than in normal littermates($P<0.05$)

第4章 *rdw* ラット卵子の体外受精および胚移植による産子の生産

T4 前処理により未成熟 *rdw* ラットの排卵誘起に成功したので、本章では T4 前処理によって排卵させた卵子と、F1 雄の精子とを体外受精させ、発生させ、レシピエント雌ラットに移植し、産子を得ることを試みた。T4+PMSG+hCG を処理して排卵させた卵子と成熟 F1(*rdw*+)の精子を体外受精させた。受精した卵子のうち、98%の卵子で精子が侵入し(Table 4)、これらの卵子の 99%において雄性和雌性の前核が形成された。さらに前核形成卵子の 47%が *in vitro* で胚盤胞にまで発生した(Table 5)。レシピエントへ移植後、1細胞胚の 21%と2細胞胚の 22%が産子にまで発達した(Table 6)。得られた産子について成育後、小人症の発症の有無と血中 T4 レベルを解析したところ、62%が *rdw/rdw* のホモの表現型を示した。桑実期と胚盤胞の胚をレシピエントの子宮に移植した場合、45%

が子宮角に着床したが、分娩には至らなかった。以上のことより、T4 前処理で未成熟 *rdw* から排卵された卵子は、*in vitro* で受精し、仮親へ移植後産子が得られることが明らかにされた。

Table 4. *In vitro* fertilization (IVF) of superovulated ova derived from immature *rdw* rats treated with gonadotrophins and thyroxine

No. of trials	No. of eggs examined	No. of penetrated eggs			No. of fragmented eggs(%) [*]
		Total(%) [*]	with PN(%) [†]	Polyspermy(%) [†]	
4	91	89(97.8)	88(98.9)	3(3.4)	2(2.2)

^{*} Percentage of the eggs examined

[†] Percentage of the eggs penetrated

PN: pronuclei

Table 5. *In vitro* development of IVF-embryos from immature *rdw* rats

No. of trials	No. of eggs cultured	No. (%) [*] of eggs developed			
		2-cell (34) [†]	≥4-cell (82) [†]	≥Morula (106) [†]	Blastocyst (130) [†]
4	45	45(100)	35(78)	31(69)	21(47)

^{*} Percentage of the eggs cultured.

[†] The time of examination(h after insemination).

第5章 *rdw/rdw* ホモ由来の精子による体外受精

rdw ラットにおいて受精能のある配偶子の生産に関して、雌についてはT4 前処理することにより多数の卵子を得る方法が確立できた。しかしながら、雄では短期(2-4 週間)のT4 前処理では、*rdw* ホモ由来の受精能のある精子を得ることができなかった。本章では、長期のT4 前処理による *rdw* ラット由来の精子を用いて体外受精-胚移植により産子を得ることを試みた。生後5 ヶ月齢の *rdw* 成熟雄ラットに、T4 を飲水(20 µg/100g 体重/日)に溶かして6 ヶ月間処理した後、正常成熟雌ラットに対する性行動、射精能力および精子受精能を調べた。その

Table 6. Pregnancies and offspring derived from IVF-embryos transferred to pseudopregnant recipients

Stage of embryos transferred	No. (%) of pregnant/ recipients	No.(%) of litters/ pregnancies	No. of embryos transferred	No. of offspring				Av.wt. (range)of newborns(g)
				Total(%)*	♂(rdw) [†]	♀(rdw) [†]	dead [‡]	
1-cell	7/7(100)	5/7(71)	66	14(21)	7(4)	6(4)	1	6.9(5.9-8.2)
2-cell	5/5(100)	4/5(80)	37	8(22)	NT	NT	8	7.8(6.9-9.4)
M&BI	10/10(100)	0/10(0)	85	0(0)				

* Percentage of the embryos transferred

[†] Numbers in parentheses indicate the numbers of *rdw* pups

[‡]Died within 2 weeks postbirth

NT: Not Test

M&BI: Morula and Blastocysts transferred

Av.wt. :Average Weight

Table 7. *In vivo* fertility of mature male *rdw*, *rdw* given T4 and normal rats

Animals	No.of animals with mating behavior/No. tested (%)	No.of females with sperm /No. paired(%)	No. of eggs fertilized/No. collected(%)
<i>rdw</i>	0/5(0)	0/5(0)	0/34(0) ^a
normal	5/5(100)	5/5(100)	35/37(95) ^b
<i>rdw</i> +T4	38/38(100)	10/38(26)	56/68 (82) ^b

^{a-b} Values with different superscripts within each column are significantly different.

結果、無処理の *rdw* ラットは性行動を示さなかったが、6 ヶ月間の T4 処理により正常雌に対する性行動を回復し、交尾能力を示す雄が出現し、その雄を交配することにより正常雌ラットの 82%が受精した(Table 7)。次に、T4 を6 ヶ月間処理した *rdw* ラットの精巢上体精子を用いて、T4 前処理した *rdw* ラットの排卵卵子を体外受精させ、移植し、産子を得ることを試みた。その結果、受精率 93%、受胎率 100%、産子生産率 52%で産子が得られた(Table 8)。得られた 22 頭の

Table 8. *In vitro* fertilization with epididymal spermatozoa from *rdw*, *rdw* given T4 and normal rats followed by embryo development *in vitro* and embryo transfer

Animal	No. of eggs fertilized/ inseminated	No. of eggs cleaved/ cultured	No. of pregnant recipients/used	No. of pups/ No. of embryos transferred
<i>rdw</i>	0/226(0)	0/0(0)	0/0(0)	0/0(0)
normal	126/129(98)a	120/122(98)	5/6(83)	22/50(44)
<i>rdw</i> +T4	362/384(94)a	254/263(97)	10/11(91)	36/107(34)
<i>rdw</i> +T4	339/364(93)b	170/181(94)	4/4(100)	22/44(52)

a, the oocytes of F1/N rats

b, the oocytes of *rdw* rats

産子は後に全てが *rdw* のホモであることが判った。以上のことにより、*rdw* のホモ同士の配偶子を体外受精させ、全てが *rdw* ホモの産子を得る方法が確立された。

第6章 *rdw* ラット胚の凍結保存

モデル動物の遺伝子を長期に維持するためには胚の凍結保存が望まれるので、本章では *rdw* ラット胚の凍結保存法の開発を試みた。近年、胚のガラス化法による超低温保存は、プログラムフリーザーなどの器材を用いることがなく、短時間で凍結が可能なことから、マウスやウシなどの胚で普及している。しかし、ラットでの報告は少なく、技術的に困難とされている。そこで耐凍剤として、新規に開発されたエチレングリコール・フコースシュークロース溶液(EFS 溶液)を用い、その濃度を2段階(エチレングリコール 20% : EFS20 から 40% : EFS40)に変え、さらに胚を封入したストローを液体窒素に曝す時間を厳密に規定してガラス化を行ない、また凍結胚の融解に要する時間と温度を厳密に設定して融解する方法を開発した。T4 前処理 *rdw* の過排卵卵子と F1 雄の精子を受精し、2細胞に発生させたものを本法により、ガラス化凍結保存を行ない、融

解後に胚の形態が正常な 2 細胞胚をレシピエント雌に移植したところ、受胎率 100%で、移植した胚 55 個中 18 個(33%)の高率で胚が新生子にまで発育した (Table 9)。以上のように、*rdw* ラット胚のガラス化法による保存方法を開発した。

Table 9. The pregnancies and pups born after the transfer of vitrified-warmed two-cell embryos derived by *in vitro* fertilization

Treatment	No. of embryos transferred	No. pregnant/ recipients used(%)	No. of live young(%) ^a
Fresh	48	4/5(80)	14(29)
Vitrified	55	6/6(100)	18(33)

^aPercentage of the embryos transferred

第 7 章 総括

① *rdw* 未成熟ラットの卵胞発育の動態を調べたところ、T4 前処理により卵胞発育が促進され、PMSG 処理後のグラフ卵胞数を増加させることが判った。しかし、*rdw* ラットでは T4 を前処理しても PMSG 処理後の LH サージはないことが判った。

② *rdw* 未成熟ラット卵巢の血管構築を調べたところ、T4 と PMSG 処理により卵胞血管の新生や拡大を促進することが判った。

③ *rdw* ラットに T4 を前処理しさらに、PMSG と hCG を処理することにより、安定した人為的排卵誘起法を確立した。

④ *rdw* ラットで誘起排卵された卵子と F1 雄精子を体外受精し、その 1-2 細胞胚をレシピエントに移植して、産子を得る方法を確立した。

⑤ 未成熟 *rdw* ラットの誘起排卵卵子と T4 を長期投与して得た *rdw* 雄ラットの精子を体外受精し、その 2 細胞胚をレシピエントに移植して、産子を得る方法を確立した。

⑥ *rdw* ラットの誘起排卵卵子と F1 精子とを受精させて得た 2 細胞胚を EFS 溶液を用いてガラス化凍結保存を行ない、融解後、高い出生率で産子が得られる方法を開発した。

以上のことより、発生工学的手法により遺伝的甲状腺機能低下症不妊ラットの生産が可能となったと考える。

論文審査結果要旨

rdw ラットは Wistar-Imamichi ラットから分離された突然変異種（ミュータント）であるが、ヒトの下垂体性小人症や甲状腺機能低下症の研究に適した動物モデルである。しかしながら、このミュータントは雌雄とも不妊であり、 F_1 同士の交配で産子を生産せざるを得ないが、このような生産方式は非常に非効率的である。そこで江君は、発生工学的手法を用いて不妊 rdw ラットを大量に生産する方法を開発するとともにその保存のために胚の凍結保存法を確立した。その概要は次の通りである。① rdw 未成熟ラットの卵胞発育の動態を調べ、T4 前処理により卵胞発育が促進され、PMSG 処理後のグラフ卵胞数を増加させることや T4 を前処理しても PMSG 処理後の LH サージがみられないことを明らかにした。② rdw 未成熟ラット卵巣の血管構築を調べ、T4 と PMSG 処理により卵胞血管の新生や拡大を促進することを明らかにした。③ rdw ラットに T4 を前処理し、さらに PMSG と hCG を処理する安定した人為的排卵誘起法を確立した。④ rdw ラットで誘起排卵された卵子と F_1 雄精子を体外受精し、その 1-2 細胞胚をレシピエントに移植して、産子を得る方法を確立した。⑤ 未成熟 rdw ラットの誘起排卵卵子と T4 を長期投与して得た rdw 雄ラットの精子を体外受精し、その 2 細胞胚をレシピエントに移植して、産子を得る方法を確立した。⑥ rdw ラットの誘起排卵卵子と F_1 精子を体外受精させて得た 2 細胞胚を EFS 溶液を用いてガラス化凍結保存を行い、融解後、高い出生率で産子が得られる方法を開発した。

以上のことより、発生工学的手法により rdw ラットの生産が可能となったと考えられ、このことは畜産学、実験動物学分野において高く評価される。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。